



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/82, C07K 14/415, A01N 65/00,</b> <b>C12N 15/29</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/58695</b> <b>(43) Date de publication internationale: 18 novembre 1999 (18.11.99)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/01085 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 7 mai 1999 (07.05.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/05877 11 mai 1998 (11.05.98) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE LYON [FR/FR]; 20, avenue Albert Einstein, F-69621 Villeurbanne (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> DELOBEL, Bernard [FR/FR]; 37, rue Lakanal, F-69100 Villeurbanne (FR). GRENIER, Annie [FR/FR]; 6, rue des Mésanges, F-69680 Chassieu (FR). GUEGUEN, Jacques [FR/FR]; La Croix de la Bauche, Chemin du Bourg, F-44240 La Chapelle sur Erdre (FR). FERRASSON, Eric [FR/FR]; 8, rue Samuel Champlain, F-44300 Nantes (FR). MBAILAO, Mbaiguinam [TD/TD]; FSEA, Boîte postale 1027, N'Djamena (TD). <b>(74) Mandataires:</b> VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).	<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
<b>(54) Title:</b> USE OF A POLYPEPTIDE DERIVED FROM A PA1b LEGUME ALBUMEN AS INSECTICIDE ✓ <b>(54) Titre:</b> UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1b DE LEGUMINEUSE COMME INSECTICIDE <b>(57) Abstract</b> The invention concerns the use of a polypeptide derived from a PA1b legume albumen as insecticide, particularly for protecting cereal grains against insect pests. <b>(57) Abrégé</b> L'invention est relative à l'utilisation d'un polypeptide dérivé d'une albumine PA1b de légumineuse comme insecticide, en particulier pour la protection des graines de céréales contre les insectes ravageurs.		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UN POLYPEPTIDE DERIVE D'UNE ALBUMINE PA1b  
DE LÉGUMINEUSE COMME INSECTICIDE

La présente invention concerne des protéines insecticides et leur utilisation pour la protection des plantes, et en particulier des céréales, de leurs graines et des produits dérivés de celles-ci contre les insectes ravageurs.

Des insectes ravageurs des graines de céréales se rencontrent dans différentes familles, en particulier parmi les Coléoptères, des Lépidoptères et des Homoptères. Chez les Coléoptères, on citera en particulier les charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*), ainsi que *Tenebrio* spp., *Rhyzopertha dominica*, *Trogoderma* spp., *Tribolium confusum*. Chez les Lépidoptères, on citera en particulier *Sitotroga cerealella* et *Ephestia kuehniella*.

Les ravageurs de graines de céréales sont parmi les principaux ennemis des récoltes qu'ils attaquent au champ (au moins dans les régions chaudes), et surtout dans les silos de conservation ; ils peuvent également attaquer les produits transformés dérivés de céréales (par exemple farines, semoules, etc.) Ces insectes causent des dégâts très importants et sont chaque année à l'origine de la destruction d'une partie importante (pouvant avoisiner 25%) de la récolte mondiale de céréales récoltées chaque année.

Pour lutter contre ces insectes, différentes méthodes ont été préconisées. L'utilisation d'insecticides (LINDANE®, puis MALATHION® et bromure d'éthylène) est actuellement remise en question, du fait des problèmes posés par la présence de résidus de ces produits dans l'alimentation. En outre, des résistances à ces produits sont apparues chez de nombreux insectes cibles, ce qui rend leur utilisation de moins en moins efficace. Pour remplacer ces insecticides ou limiter leur usage, différentes méthodes ont été proposées [pour

revue, cf par exemple F.H ARTHUR, J. Stored Prod. Res., 32, pp. 293-302, (1996)]. Les plus développées actuellement sont des méthodes physiques, telles que le refroidissement des silos, la conservation sous CO<sub>2</sub> ou sous azote ; ces méthodes sont toutefois onéreuses, et leur mise en œuvre, qui nécessite une haute technicité, est délicate ; elles ne sont donc pas applicables partout.

Un autre type d'approche, qui fait l'objet de nombreuses recherches, consiste à produire des plantes transgéniques exprimant un ou plusieurs gène(s) leur conférant une résistance contre l'attaque des insectes. Cependant, cette approche nécessite que l'on dispose de gènes appropriés, qui doivent en outre être acceptables à la fois pour l'environnement et par les consommateurs.

La plupart des insectes présentent une spécificité alimentaire plus ou moins stricte ; c'est ainsi que les graines de céréales sont attaquées par les charançons des grains (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*), qui n'attaquent pas les graines de légumineuses ; par contre, d'autres ravageurs, tels que les bruches, attaquent les légumineuses, mais pas les céréales.

Des travaux précédents de l'équipe des Inventeurs [DELOBEL et GRENIER, J. Stored Prod. Res., 29, pp. 7-14, (1993)], ont montré que les trois espèces de *Sitophilus* mentionnées ci-dessus pouvaient se développer sur des châtaignes ou des glands, mais qu'en revanche elles mouraient rapidement sur pois cassés, cette mortalité étant consécutive à la consommation des pois par ces charançons.

Les Inventeurs ont entrepris de rechercher la substance toxique responsable de cette mortalité. Il est par ailleurs connu que les légumineuses renferment plusieurs substances entomotoxiques, et qu'il existe chez diverses espèces d'insectes pour lesquelles les

légumineuses sont toxiques, des sous-populations naturelles plus ou moins résistantes à la toxicité des légumineuses.

Par exemple, dans le cas des charançons des grains, un test effectué par l'équipe des Inventeurs sur 90 souches d'origines géographiques différentes, a montré que 4 souches appartenant à l'espèce *Sitophilus oryzae* comportaient des individus capables de survivre sur pois cassés au stade adulte ; en revanche, aucune souche possédant cette faculté n'a été mise en évidence chez les espèces *Sitophilus zeamais*, ou *Sitophilus granarius* ; l'étude du déterminisme génétique de cette résistance a montré que ce caractère est monogénique, récessif et autosomal [GRENIER et al., Heredity, 79, pp. 15-23, (1997)].

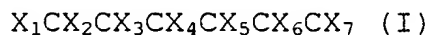
Les Inventeurs ont sélectionné une souche de *S. oryzae* homozygote pour ce gène de résistance, et ont utilisé cette souche pour rechercher la substance toxique vis-à-vis de laquelle se manifestait le mécanisme de résistance codé par ce gène.

Les Inventeurs ont ainsi constaté que cette toxicité était associée aux isoformes d'une protéine, de séquence similaire à celle de l'albumine de pois PA1b décrite par HIGGINS et al., [J. Biol. Chem., 261(24), pp. 11124-11130, (1986)], et présentant une forte similitude (65% d'identité) avec la leginsuline de soja [WATANABE et al., Eur. J. Biochem., 15, pp. 224:1-167-72, (1994)]. Aucune propriété entomotoxique n'avait jusqu'à présent été associée à la protéine PA1b, à la leginsuline ou à d'autres protéines homologues.

L'alignement de la séquence de l'une des isoformes de la protéine purifiée par les Inventeurs, avec celles de la protéine PA1b de pois, publiée par HIGGINS et al. et de la leginsuline de soja publiée par WATANABE et al., est représentée sur la Figure 7. Ces 3

séquences comportent en particulier 6 résidus cystéines occupant des positions conservées.

La présente invention a pour objet l'utilisation en tant qu'insecticide, d'un polypeptide comprenant une séquence répondant à la formule générale (I) suivante :



dans laquelle C représente un résidu cystéine,  $X_1$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10 acides aminés,  $X_2$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 5 acides aminés,  $X_3$  représente une séquence de 4 à 10 acides aminés,  $X_4$  représente une séquence de 3 à 10 acides aminés,  $X_5$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 4 acides aminés,  $X_6$  représente une séquence de 7 à 15 acides aminés,  $X_7$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10 acides aminés.

De préférence,  $X_1$  représente un dipeptide,  $X_2$  représente un tripeptide,  $X_3$  représente un heptapeptide,  $X_4$  représente un tétrapeptide,  $X_5$  représente un acide aminé,  $X_6$  représente un nonapeptide, et  $X_7$  représente un pentapeptide.

Avantageusement :

- $X_1$  répond à la séquence  $y_1y_2$  dans laquelle  $y_1$  et  $y_2$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien  $y_1$  représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, et  $y_2$  représente l'acide glutamique ou l'acide aspartique ; et/ou
- $X_2$  répond à la séquence  $y_3y_4y_5$  dans laquelle  $y_3$  représente la glutamine ou l'asparagine, et  $y_4$  et  $y_5$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ; et/ou

- X<sub>3</sub> répond à la séquence y<sub>6</sub>y<sub>7</sub>y<sub>8</sub>y<sub>9</sub>y<sub>10</sub>y<sub>11</sub>y<sub>12</sub> dans laquelle y<sub>6</sub> représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y<sub>7</sub>, y<sub>11</sub>, et y<sub>12</sub> représentent chacun la proline, y<sub>8</sub> représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, y<sub>9</sub> représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique, y<sub>10</sub> représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ; et/ou
- 10 - X<sub>4</sub> répond à la séquence y<sub>13</sub>y<sub>14</sub>y<sub>15</sub>y<sub>16</sub>, dans laquelle y<sub>13</sub>, y<sub>14</sub>, y<sub>15</sub>, y<sub>16</sub>, représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien y<sub>14</sub> représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y<sub>13</sub> et y<sub>15</sub> représentent chacun un acide aminé basique, et y<sub>16</sub> représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique ; et/ou
- X<sub>5</sub> représente un acide aminé basique ; et/ou
- X<sub>6</sub> répond à la séquence y<sub>17</sub>y<sub>18</sub>y<sub>19</sub>y<sub>20</sub>y<sub>21</sub>y<sub>22</sub>y<sub>23</sub>y<sub>24</sub>y<sub>25</sub>, dans laquelle y<sub>17</sub>, y<sub>19</sub>, y<sub>21</sub>, et y<sub>23</sub> représentent chacun un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y<sub>18</sub> représente la proline, y<sub>20</sub> et y<sub>24</sub> représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y<sub>22</sub> représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, et y<sub>25</sub> représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine ; et/ou
- 20 - X<sub>7</sub> répond à la séquence y<sub>26</sub>y<sub>27</sub>y<sub>28</sub>y<sub>29</sub>y<sub>30</sub> dans laquelle y<sub>26</sub> représente un acide aminé basique, ou un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y<sub>27</sub> représente l'asparagine ou la glutamine ou un acide aminé basique, y<sub>28</sub> représente la proline, et y<sub>29</sub> et y<sub>30</sub> représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine.
- 35

Selon un mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, le polypeptide utilisé comme insecticide présente au moins 40%, de préférence au moins 60% d'homologie avec une quelconque des isoformes d'une albumine PAIb.

Au sens de la présente invention, on entend par : « albumine PAIb » non seulement toute isoforme de la protéine PAIb de pois, mais également toute protéine de la même famille présente chez d'autres plantes, et pouvant notamment être purifiée à partir de graines de légumineuses, en particulier des légumineuses de la famille des Cesalpinaceae, des Mimosaceae ou des Fabaceae, ou de Méliacées, telles que *Khaya senegalensis*.

Des polypeptides utilisables conformément à l'invention, peuvent être des polypeptides naturels, par exemple les leginsulines de légumineuses, telle que la leginsuline de soja décrite par WATANABE et al. ; il peut s'agir également de polypeptides artificiels dont la séquence est dérivée de celle d'une PAIb par l'addition, la délétion, ou la substitution d'un petit nombre d'acides aminés. On peut par exemple utiliser des polypeptides comprenant une séquence répondant à la formule générale (I), ou une portion de celle-ci correspondant à la région impliquée dans l'activité insecticide. Ce peptide actif peut éventuellement être fusionné à son extrémité N-terminale et/ou à son extrémité C-terminale avec une autre séquence peptidique.

Ces polypeptides peuvent être obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, par exemple par synthèse peptidique, ou par génie génétique, en exprimant, dans une cellule-hôte appropriée une séquence codant pour le polypeptide souhaité. Ils peuvent également, dans le cas des polypeptides naturels, tels que la PAIb et la leginsuline, être purifiés à partir de graines de plantes telles que des légumineuses ou des Méliacées.



Conformément à l'invention, les polypeptides comprenant une séquence de formule générale (I) peuvent être utilisés en tant que seul principe actif d'un insecticide, ou bien associés à un ou plusieurs autres principes actifs. Ils peuvent être utilisés en particulier, pour lutter contre les insectes ravageurs des graines de céréales, et également contre des insectes phytophages, tels que les lépidoptères *Mamestra brassicae* ou *Ostrinia nubilalis* ou les coléoptères *Curculionidae* comme *Phaedon cochleariae* ou *Curculionidae* comme *Anthonomus grandis* ou contre des Insectes phloemophages tels que les pucerons.

En outre, les Inventeurs ont constaté que la protéine PA1b conservait son activité insecticide pendant plusieurs années dans les graines sèches, et que cette activité n'était pas affectée par un chauffage à 100°C.

D'autre part, cette protéine n'est pas toxique pour l'homme ou les animaux supérieurs ; elle est présente dans les légumineuses qui font partie de leur alimentation habituelles.

Les polypeptides de séquence générale (I), sont particulièrement bien adaptés pour la protection, en particulier pendant le stockage, des graines, des farines, ou des produits transformés qui en sont dérivés.

Pour la mise en œuvre de la présente invention, la concentration du polypeptide de séquence (I) au niveau du produit à protéger (plante, graines, ou produits dérivés) est généralement de 10  $\mu$ moles/kg à 100 mmoles/kg (ou de 10  $\mu$ M à 100mM), et avantageusement de 50  $\mu$ moles/kg à 10 mmoles/kg (ou de 50  $\mu$ M à 10mM).

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, on traite le produit à protéger avec une préparation comprenant ledit polypeptide. Celui-ci peut par exemple être sous forme d'une préparation purifiée ou d'une fraction enrichie, qui peuvent

notamment être obtenues à partir de graines de plantes produisant naturellement ledit polypeptide, ou bien à partir de cultures de cellules exprimant un gène codant pour ce polypeptide.

5           Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré de la présente invention, on produit une plante transgénique, transformée par au moins un gène codant pour ledit polypeptide, et exprimant ce dernier dans au moins un de ses tissus ou organes.

10           La présente invention englobe également les plantes transgéniques produites de la sorte ; avantageusement, lesdites plantes sont des céréales.

          Ces plantes peuvent être obtenues par les techniques habituelles de transgénèse végétale, qui sont  
15   connues en elles-mêmes.

          Il est ainsi possible d'obtenir dans une plante une expression ubiquitaire et/ou une expression ou une surexpression dans certains tissus ou organes (par exemple dans les graines) d'un polypeptide de  
20   séquence (I), et de ce fait de protéger la plante, le tissu ou l'organe concerné, contre les attaques d'insectes pour lesquels ce polypeptide est toxique. En particulier, l'expression d'un polypeptide de  
25   séquence (I) dans les graines permet de protéger celles-ci, même après la récolte, ainsi que les farines et les produits transformés obtenus à partir de ces graines.

          La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre qui se réfère à des exemples non-limitatifs, décrivant la  
30   purification et illustrant les propriétés insecticides d'une albumine PA1b de légumineuse.

#### **EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA TOXICITÉ DE DIFFÉRENTES FARINES DE LEGUMINEUSES POUR DES CHARANCONS DES CÉRÉALES**

          La toxicité de farines de différentes  
35   légumineuses a été testée sur des charançons (*Sitophilus oryzae*). Les expérimentations ont été effectuées en

parallèle sur des animaux de type sauvage (souche sensible S), et sur des mutants survivant à l'alimentation sur pois (souche résistante R).

Les charançons (*Sitophilus oryzae*) sont élevés en enceinte régulée à 27,5°C et 70% d'humidité relative. De jeunes adultes âgés d'une semaine sont prélevés dans ces élevages de masse pour les tests. Pour chaque test, des lots de 30 insectes sont mis en expérimentation, et la mortalité journalière est notée.

Des boulettes de farine sont pétries avec de l'eau, mises à sécher 24 h, et utilisées pour l'alimentation des charançons. La farine grise de blé utilisée est complétée avec différentes proportions de farine de légumineuse, tamisée à 0,2 mm d'ouverture de maille.

Les courbes dose-réponse de mortalité des charançons ont été obtenues en utilisant différentes doses de chaque farine à tester. Les résultats sont traités par le programme « Toxicologie » [FEBVAY et RAHBÉ, « Toxicologie », un programme pour l'analyse des courbes de mortalité par la méthode des probits sur MacIntosh, Cahiers Techn. INRA, 27, pp. 77-78 (1991)]. Ce programme utilise la transformation en Probits des mortalités cumulées et détermine l'équation de la courbe de régression et la concentration létale 50%. Ces valeurs sont déterminées après 4 et 7 jours d'exposition.

En outre, pour chaque concentration de farine de pois, les temps létaux 50% (TL50) pour la souche sensible S ont également été calculés. La courbe d'étalonnage ainsi établie permettra de déterminer dans la suite des expérimentations, pour chaque farine ou fraction de farine testée, la concentration équivalente en farine de pois (en % de pois dans le blé). Cette courbe est représentée sur la Figure 1.

### Toxicité de la farine de pois :

La Figure 2 représente la mortalité cumulée pour des adultes de la souche sensible S de *Sitophilus oryzae*, sur pois ( $\diamond$ ), et sur blé ( $\square$ ), en fonction du  
5 temps d'alimentation en jours. Ces résultats montrent que les charançons des céréales sont rapidement tués sur pois : en 8 jours, entre 90 et 100% des adultes sont morts.

La Figure 3 représente la mortalité à 6 jours  
10 de *Sitophilus oryzae* pour des boulettes à différentes concentrations de farine de poids ; la souche résistante (R) et la souche sensible (S) sont comparées. La courbe dose/réponse ainsi établie montre que, pour la souche sensible (S) on observe, dès 10% de farine de poids, 70%  
15 de mortalité en 6 jours (et 100% en 14 jours). Dans le même temps, la souche résistante (R) n'est pas affectée.

### Toxicité de farines d'autres légumineuses :

Parmi les graines de légumineuses utilisées en alimentation humaine, 10 ont été testées pour leur action  
20 sur les charançons sensibles et résistants.

Des boulettes contenant 80% de farine de légumineuse et 20% de farine de blé ont été utilisées. La Figure 4 illustre la mortalité cumulée des charançons *Sitophilus oryzae*, souche résistante R ( $\boxtimes$ ) ou souche  
25 sensible S ( $\boxdot$ ), mesurée après 5 (4 A), 7 (4 B), 14 (4 C) et 20 jours (4 D) d'alimentation sur niébé (*Vigna unguiculata*) variété blanche (1) et rouge (2), pois de terre (3 : *Vigna subterranea*), lentille (4 : *Lens esculenta*), haricot (5 : *Phaseolus vulgaris*), haricot  
30 mungo (6 : *Vigna radiata*), adzuki (7 : *Vigna angularis*), fève (8 : *Vicia faba*), pois chiche (9 : *Cicer arietinum*), et lupin (10 : *Lupinus albus*).

Les résultats montrent qu'à 7 jours toutes les légumineuses sont toxiques pour la souche sensible, même  
35 si *Vigna subterranea* et *Cicer arietinum* n'ont pas encore

tué tous les insectes qui y vivent ; par contre, la souche résistante ne présente pas ou très peu de mortalité. On peut donc en conclure qu'un même mécanisme à l'origine de la toxicité, est présent chez toutes ces  
5 légumineuses ; ce mécanisme apparaît en particulier comme prédominant chez *Vigna subterranea*, *Vigna radiata* et *Cicer arietinum*.

Toutefois, l'examen des mortalités à 14 et 20 jours sur certaines légumineuses, fait apparaître pour la  
10 souche résistante une mortalité plus ou moins grande, qu'il faut donc imputer à d'autres mécanismes ; c'est en particulier le cas sur *Phaseolus vulgaris* et sur *Vigna angularis*.

**EXEMPLE 2 - PURIFICATION ET IDENTIFICATION DE LA  
15 SUBSTANCE RESPONSABLE DE LA TOXICITÉ CHEZ LE POIS**

**Préparation d'une fraction protéique enrichie en albumines (SRA1).**

La fraction enrichie en albumine est préparée à l'échelle pilote selon le protocole développé par  
20 CREVIEU et al. [Nahrung, 40(5), pp. 237-244, (1996)].

La farine de pois (10 kg) est mélangée sous agitation avec 140 litres de tampon acétate (pH 4,9), le mélange est centrifugé à 7500 t/min, le surnageant est soumis à une ultrafiltration sur membrane M5, à une  
25 température qui ne dépasse pas 25°C. Le rétentat est soumis à une diafiltration sur la même membrane, le nouveau rétentat est centrifugé à 6000 t/min pendant 20 min et le surnageant lyophilisé. La poudre obtenue (SRA1) qui représente en moyenne 1% de la masse mise en  
30 oeuvre au départ, est utilisée pour les purifications ultérieures.

A chaque étape de la purification, la toxicité des différentes fractions est déterminée selon le protocole décrit à l'exemple 1 ci-dessus.

### Chromatographie d'échange d'anions

10 g de SRA1 sont mis en suspension dans 100 ml d'une solution de méthanol à 60% et agités 1 heure à 4°C. Après centrifugation (30 min, 9000 g, 4°C) le surnageant est récupéré puis le méthanol présent est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le volume est alors réajusté à 100 ml par de l'eau et un tampon Tris-HCl 1M (pH 8,8) de manière à obtenir une concentration finale de 50 mM en Tris-HCl. Les protéines solubles sont fractionnées par chromatographie d'échange d'anions sur une colonne (120 x 50 mm) de DEAE SEPHAROSE FAST FLOW. Les protéines adsorbées sont éluées par une concentration de 50% de tampon B (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8 ; NaCl 500 mM) dans le tampon A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8). Le débit d'élution est de 20 ml/min et les fractions collectées ont un volume de 80 ml. Les protéines sont détectées par absorption à 280 nm.

Le chromatogramme est représenté sur la Figure 5. La concentration en tampon B est indiquée par la ligne discontinue. Les fractions de 80 ml correspondant aux pics sont réunies en deux fractions principales, DEAE NA et DEAE 1, indiquées sur le chromatogramme par les lignes horizontales. La fraction non adsorbée (DEAE NA) contient toute la toxicité.

Cette fraction est dialysée 72 heures contre de l'eau puis lyophilisée. On obtient ainsi environ 450 mg de la fraction DEAE NA.

### Chromatographie HPLC phase inverse semi-préparative.

La fraction DEAE NA obtenue après chromatographie échangeuse d'anions est fractionnée par chromatographie HPLC phase inverse (RP-HPLC) sur une colonne HYPERSIL (250 x 10,5 mm) remplie de NUCLEOSIL 5 µm 300 Å greffé par une chaîne aliphatique en C18. Pour chaque chromatographie, 15 mg de protéines sont déposées sur la colonne. Le débit d'élution est de 3 ml/min et les

protéines sont détectées par absorption à 220 nm. Les protéines sont éluées par un gradient de tampon B (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'acétonitrile) dans le mélange A (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'eau) selon la séquence suivante : t=0 min, 40% de B ; t=5 min, 40% de B ; t=17 min, 48% de B ; t=18 min, 80% de B ; et t=23 min, 80% de B.

Le chromatogramme est illustré par la Figure 6. Le gradient d'acétonitrile est représenté par la ligne discontinue. La toxicité est localisée uniquement au niveau des pics F1 et PT ; les fractions correspondant à ces pics qui ont été collectées, sont représentées sur le chromatogramme par des traits horizontaux,.

Trente chromatographies successives correspondant à une quantité injectée de 450 mg de DEAE NA ont été effectuées. Les fractions ont été réunies puis lyophilisées après évaporation de l'acétonitrile et de l'acide trifluoroacétique au SPEED VAC. 4 mg de la fraction PT et 5 mg de F1 ont ainsi été obtenues. Ces fractions ont ensuite été analysées par chromatographie HPLC phase inverse (RP-HPLC).

#### **Chromatographie HPLC phase inverse**

Le contrôle de la pureté des protéines des fractions F1 et PT est effectué par chromatographie HPLC phase inverse sur une colonne INTERCHROM (250 x 4,6 mm) remplie de NUCLÉOSIL 5 µm 100 Å greffé par une chaîne aliphatique en C18. Le débit d'élution est de 1 ml/min et les protéines sont détectées par absorption à 220 nm.

Les protéines sont éluées en 45 minutes par un gradient linéaire de 0 à 50% de mélange B (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'acétonitrile) dans le mélange A (0,04% d'acide trifluoroacétique dans de l'eau).

Cette analyse montre que la fraction PT ne contient que la protéine toxique PT. La fraction F1 est plus complexe et contient deux polypeptides majeurs.

### Caractérisation des protéines présentes dans les fractions PT et F1

Les déterminations de masses ont été réalisées par spectrométrie de masse à électrospray (ES-MS). Les masses moyennes calculées à partir de 2 estimations, sont de 3741,1 Da dans le cas de PT, et de 3736 et 3941 Da pour les polypeptides de la fraction FT.

Le nombre de cystéines libres et impliquées dans les ponts disulfures, a été déterminé par alkylation de la protéine par l'iodoacétamide, avant et après réduction, et comparaison des temps de rétention en RP-HPLC et des masses en ES-MS, des protéines alkylées avec la protéine native.

La protéine non-réduite alkylée présente un temps de rétention et une masse identiques à celle de la protéine native. En revanche, la protéine réduite puis alkylée présente un temps de rétention nettement différent de celui observé pour la protéine native (30 min au lieu de 42 min), et une masse de 4089,9 Da.

Il apparaît donc que cette protéine contient 6 cystéines, qui sont toutes impliquées dans 3 ponts disulfures.

### Séquence complète de la protéine PT

La séquence complète de la protéine PT a été établie. La masse calculée à partir des 37 résidus de la protéine est 3741,4 Da, ce qui est identique, à l'erreur de mesure près, à celle déterminée par spectrométrie de masse (3741,1 Da) pour la protéine native. La valeur calculée pour la protéine alkylée par l'iodoacétamide (4090 Da) est également équivalente à celle obtenue expérimentalement (4089,9 Da). Ces résultats démontrent l'absence de modifications post-traductionnelles (glycosylations, phosphorylations...) de la protéine.

La séquence de la protéine PT présente une très forte homologie avec celle de l'albumine de pois



PA1b [HIGGINS et al, J. Biol. Chem, 261(24), pp. 11124-11130, (1986)]. Les deux séquences ne diffèrent que par le remplacement du résidu valine en position 29 dans la protéine PT par une isoleucine dans la PA1b. Une forte  
5 similitude (62% d'identité, 89% d'homologie, déterminées à l'aide du logiciel MAC MOLLY utilisant la matrice BLOSUM62) est également observée entre la protéine PT et la leginsuline de soja [WATANABE et al., Eur. J. Biochem., 15, pp. 224:1-167-72, (1994)]. En particulier,  
10 les 6 résidus cystéine, qui jouent un rôle essentiel dans la structure des protéines, occupent des positions conservées.

La comparaison de ces 3 séquences est illustrée par la figure 7.

15 Ces résultats permettent de conclure que la protéine responsable de la résistance du pois aux charançons des céréales est similaire à la protéine PA1b décrite par HIGGINS. Cette protéine est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine de 130 résidus (PA1) qui  
20 subit une maturation post-traductionnelle libérant la protéine PA1b ainsi qu'une protéine de 53 résidus nommée PA1a [HIGGINS et al., J. Biol. Chem., 261(24), pp. 11124-11130, (1986)].

Le séquençage des 10 premiers résidus N-terminaux de chacun des polypeptides toxiques de la  
25 fraction F1 a également été réalisé. Les séquences obtenues sont identiques à celle de l'extrémité N-terminale de la protéine PT. Comme, d'autre part, les masses de ces polypeptides déterminées par ES-MS sont  
30 très proches de celle de la PT, il apparaît que ces polypeptides représentent des isoformes de la PT.

**EXEMPLE 3 - ACTIVITÉ ET STABILITÉ DES PROTÉINES ENTOMOTOXIQUES EXTRAITES DU POIS**

**Activité :**

L'activité entomotoxique des polypeptides de la fraction PT ou de la fraction F1 a été déterminée comme décrit à l'exemple 1 ci-dessus ; à la concentration de 1% dans la farine de blé (3mmoles/kg), ces polypeptides ont pour le charançon une toxicité équivalente à celle de la farine de pois pure. Une concentration de 60  $\mu$ moles/kg est suffisante pour empêcher toute infestation par les charançons.

**Stabilité :**

Les polypeptides de la fraction PT ou de la fraction F1, extraits à partir de graines sèches stockées pendant plusieurs années, conservent leur activité entomotoxique. En outre, cette activité n'est pas affectée par un chauffage à 100°C.

**Toxicité pour différents insectes :**

La toxicité de la protéine PT pour la teigne de la farine *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera), et pour le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera) a également été testée.

Les essais sur la teigne de la farine ont été effectués sur des larves de premier et deuxième stade d'*Ephestia kuehniella* alimentées sur des boulettes de farine de blé contenant différentes concentrations de la protéine PT (en mmoles par kg de farine de blé). Les résultats sont illustrés par la Figure 8.

(○ = Survie à 0 jour ;  
▲ = Survie à 4 jours ;  
□ = Survie à 10 jours).

Ces résultats montrent que cette protéine est très toxique, dès la concentration de 0,25mmoles/kg.

Le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera), a été nourri sur milieu artificiel contenant différentes concentrations de la protéine PT.

- 5           (□ = 3,3  $\mu$ M ;  
          ▲ = 17  $\mu$ M ;  
          ◆ = 46  $\mu$ M ;  
          ○ = 84  $\mu$ M ;  
          ■ = 100  $\mu$ M).

10       Les résultats, qui sont illustrés par la Figure 9, montrent qu'une importante mortalité apparaît dès la concentration de 46  $\mu$ molaire, mortalité qui est totale à 100  $\mu$ molaire.

## REVENDEICATIONS

1) Utilisation comme insecticide d'un polypeptide comprenant une séquence répondant à la formule générale (I) suivante :

5  $X_1CX_2CX_3CX_4CX_5CX_6CX_7$  (I)

dans laquelle C représente un résidu cystéine,  $X_1$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10 acides aminés,  $X_2$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 5 acides aminés,  $X_3$  représente une  
10 séquence de 4 à 10 acides aminés,  $X_4$  représente une séquence de 3 à 10 acides aminés,  $X_5$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 4 acides aminés,  $X_6$  représente une séquence de 7 à 15 acides aminés,  $X_7$  représente un acide aminé ou une séquence de 2 à 10  
15 acides aminés.

2) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que  $X_1$  représente un dipeptide,  $X_2$  représente un tripeptide,  $X_3$  représente un heptapeptide,  $X_4$  représente un tétrapeptide,  $X_5$  représente un acide  
20 aminé,  $X_6$  représente un nonapeptide, et  $X_7$  représente un pentapeptide.

3) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que :  
-  $X_1$  répond à la séquence  $y_1y_2$  dans laquelle  $y_1$  et  $y_2$   
25 représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien  $y_1$  représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, et  $y_2$  représente l'acide glutamique ou l'acide aspartique ; et/ou  
30 -  $X_2$  répond à la séquence  $y_3y_4y_5$  dans laquelle  $y_3$  représente la glutamine ou l'asparagine, et  $y_4$  et  $y_5$  représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, la thréonine, la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ;  
35 et/ou

- X<sub>3</sub> répond à la séquence y<sub>6</sub>y<sub>7</sub>y<sub>8</sub>y<sub>9</sub>y<sub>10</sub>y<sub>11</sub>y<sub>12</sub> dans laquelle y<sub>6</sub> représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y<sub>7</sub>, y<sub>11</sub>, et y<sub>12</sub> représentent chacun la proline, y<sub>8</sub> représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, y<sub>9</sub> représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique, y<sub>10</sub> représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine ; et/ou
- 5
- 10 - X<sub>4</sub> répond à la séquence y<sub>13</sub>y<sub>14</sub>y<sub>15</sub>y<sub>16</sub>, dans laquelle y<sub>13</sub>, y<sub>14</sub>, y<sub>15</sub>, y<sub>16</sub>, représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, ou bien y<sub>14</sub> représente un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y<sub>13</sub> et y<sub>15</sub> représentent chacun un acide aminé basique, et y<sub>16</sub> représente l'acide aspartique ou l'acide glutamique ; et/ou
- 15
- X<sub>5</sub> représente un acide aminé basique ; et/ou
- X<sub>6</sub> répond à la séquence y<sub>17</sub>y<sub>18</sub>y<sub>19</sub>y<sub>20</sub>y<sub>21</sub>y<sub>22</sub>y<sub>23</sub>y<sub>24</sub>y<sub>25</sub>, dans laquelle y<sub>17</sub>, y<sub>19</sub>, y<sub>21</sub>, et y<sub>23</sub> représentent chacun un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y<sub>18</sub> représente la proline, y<sub>20</sub> et y<sub>24</sub> représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine, y<sub>22</sub> représente un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine, et y<sub>25</sub> représente un acide aminé choisi parmi la phénylalanine, le tryptophane, et la tyrosine ; et/ou
- 20
- 25
- 30 - X<sub>7</sub> répond à la séquence y<sub>26</sub>y<sub>27</sub>y<sub>28</sub>y<sub>29</sub>y<sub>30</sub> dans laquelle y<sub>26</sub> représente un acide aminé basique, ou un acide aminé choisi parmi la valine, la leucine, l'isoleucine, et la méthionine, y<sub>27</sub> représente l'asparagine ou la glutamine ou un acide aminé basique, y<sub>28</sub> représente la proline, et y<sub>29</sub> et y<sub>30</sub> représentent chacun un acide aminé choisi parmi l'alanine, la sérine, la glycine, et la thréonine.
- 35

- 4) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le polypeptide utilisé comme insecticide présente au moins 60% d'identité avec une quelconque des isoformes d'une albumine PA1b.
- 5) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit polypeptide est choisi dans le groupe constitué par les albumines PA1b et les leginsulines.
- 6) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé pour protéger des graines de céréales ou des produits dérivés de celles-ci, contre des insectes ravageurs.
- 7) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé pour protéger des plantes contre les insectes ravageurs des graines de céréales.
- 8) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé à une concentration de 10  $\mu$ moles/kg à 100 mmoles/kg.
- 9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit polypeptide est utilisé à une concentration de 50  $\mu$ moles/kg à 10 mmoles/kg.
- 10) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend le traitement du produit à protéger avec une préparation comprenant ledit polypeptide.
- 11) Utilisation selon une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comprend la production d'une plante transgénique, transformée par au moins un gène codant pour ledit polypeptide, et exprimant ce dernier dans au moins un de ses tissus ou organes.

12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante transgénique est une céréale.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



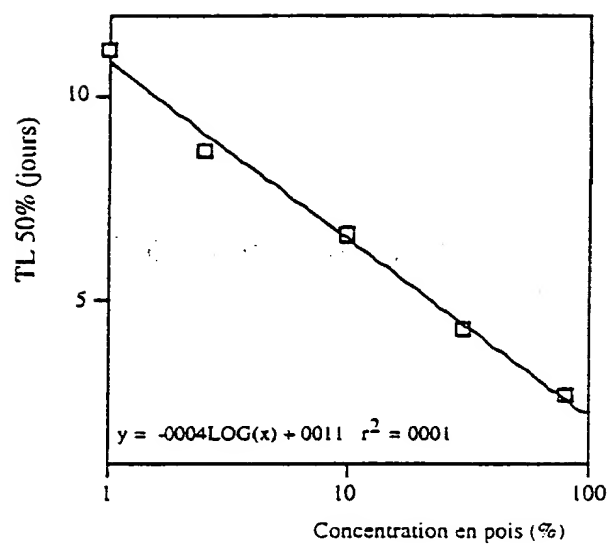


FIGURE 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

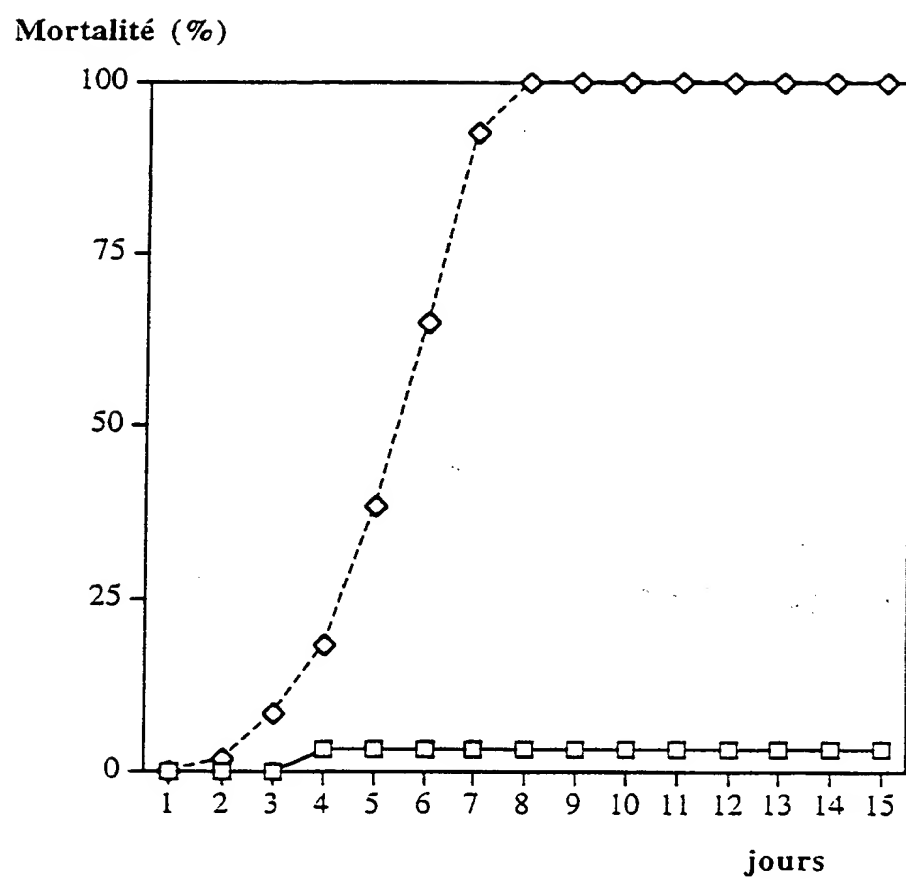


FIGURE 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

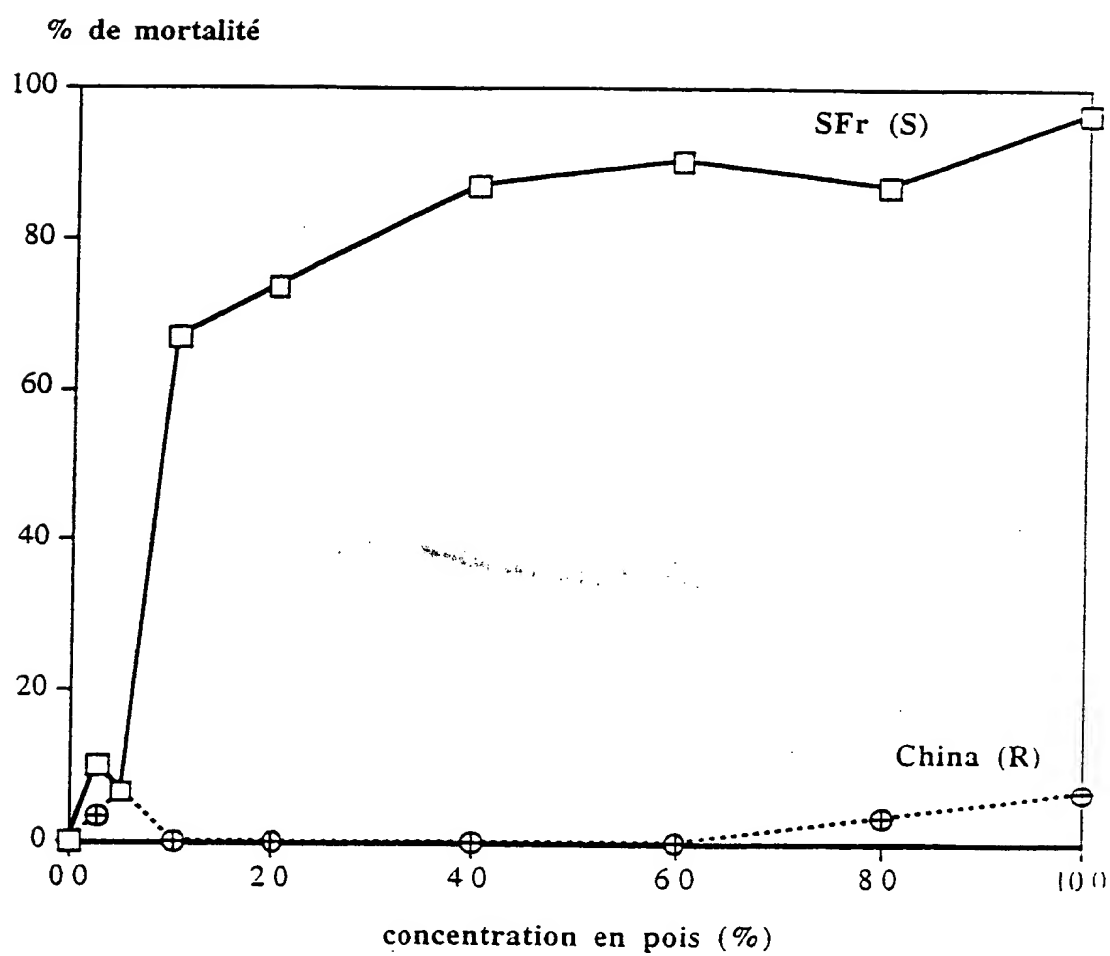


FIGURE 3

7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/9

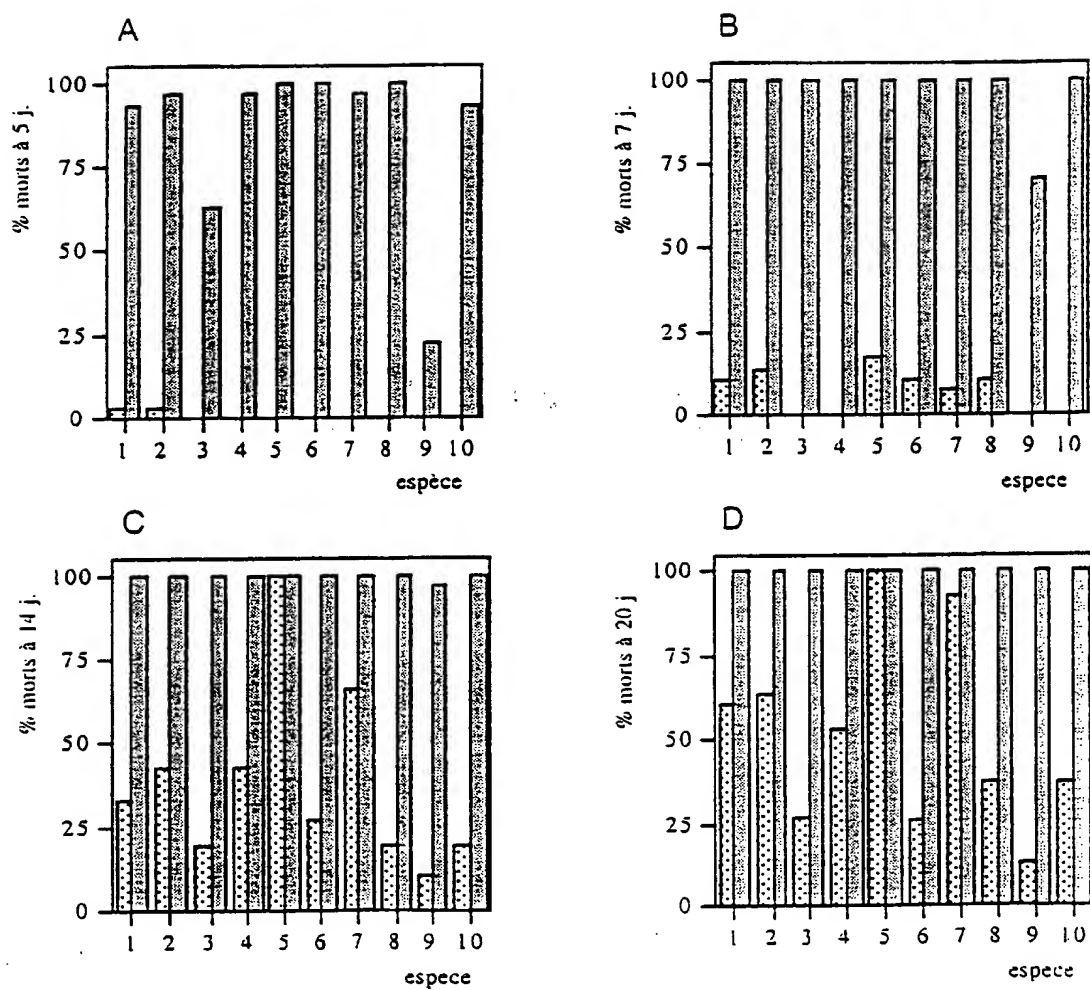


FIGURE 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



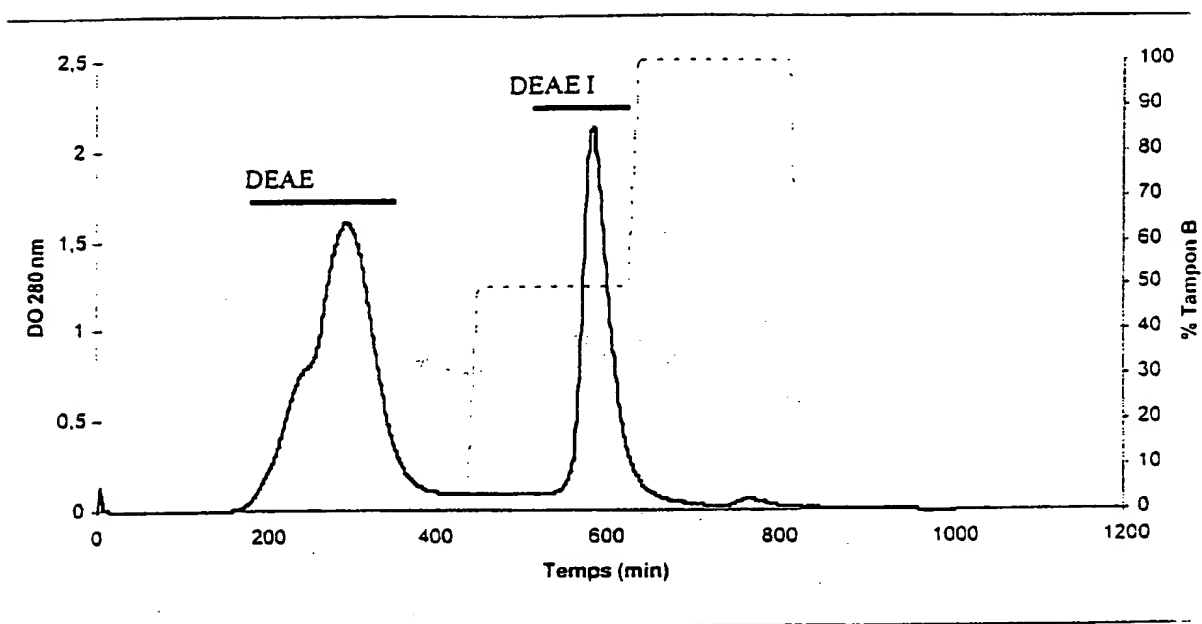


FIGURE 5



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

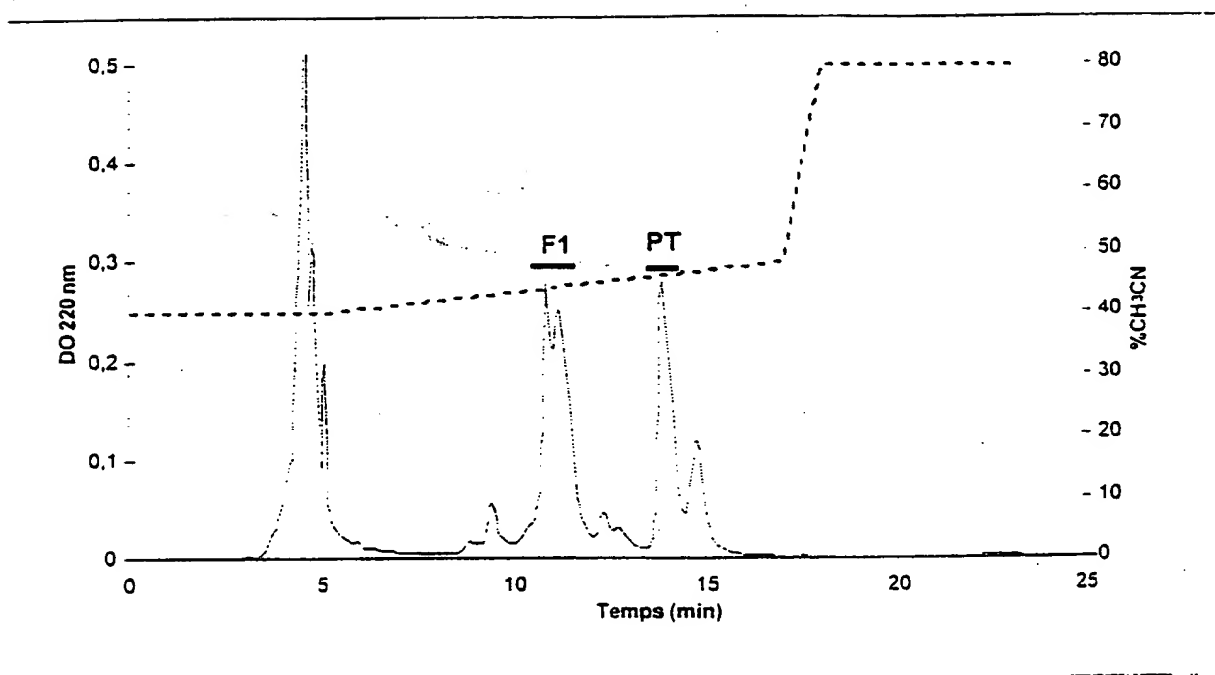


FIGURE 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

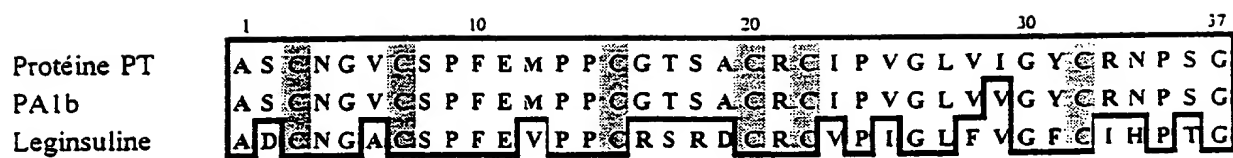


FIGURE 7



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

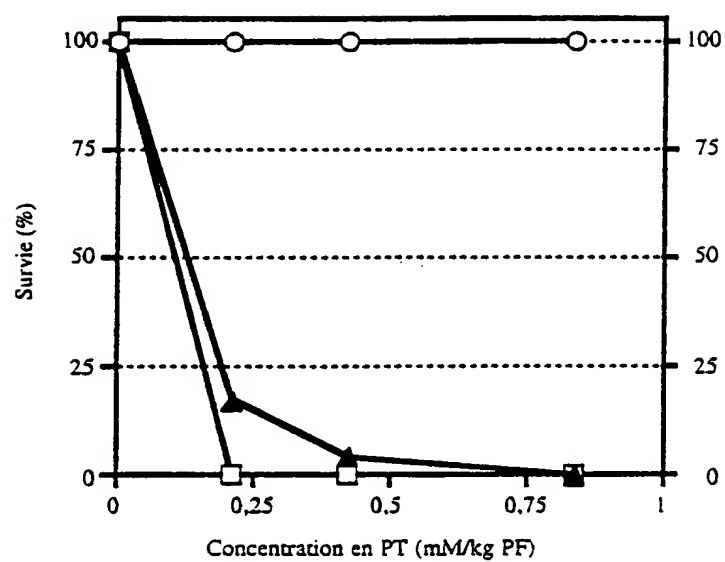


FIGURE 8



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



9/9

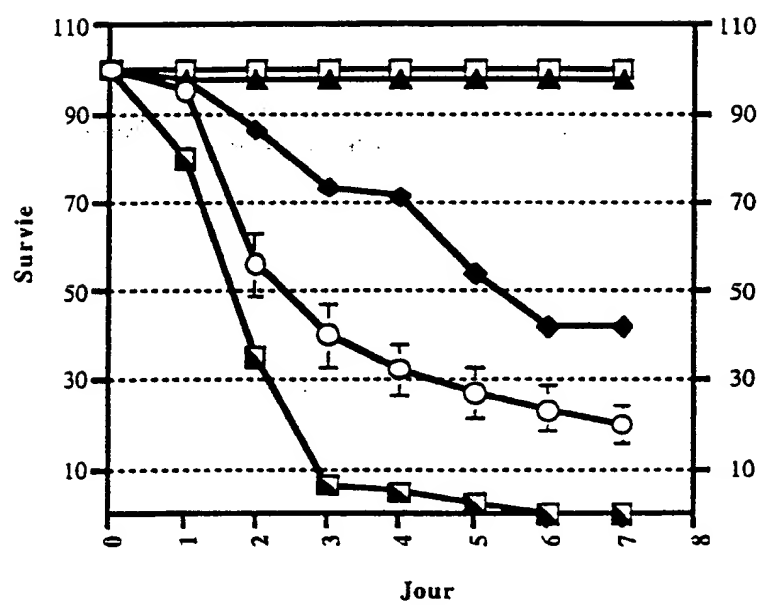


FIGURE 9

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 99/01085

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6    C12N15/82    C07K14/415    A01N65/00    C12N15/29		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6    C12N    C07K    A01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	HIGGINS T J V ET AL: "Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol. 261, no. 24, 25 août 1986 (1986-08-25), pages 11124-11130, XP002091347 MD    US cité dans la demande * le document en entier, particulièrement page 11129 *	1-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span>---</span> <span>---/---</span> </div>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents         </div> <div style="width: 45%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe         </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="width: 50%; font-size: x-small;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 50%; font-size: x-small;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-size: large;">7 septembre 1999</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-size: large;">16/09/1999</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-size: large;">De Kok, A</div>

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	BAKER J E ET AL: "Multiplicity of albumins from wheat inhibitory to amylase from the rice weevil coleoptera curculionidae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, vol. 82, no. 6, 1989, pages 1548-1553, XP002091350 abrégé	1-12
A	WATANABE Y ET AL: "A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein" THE EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 224, no. 1, août 1994 (1994-08), pages 167-172, XP002091348 BERLIN DE cité dans la demande le document en entier	1-5, 11
A	EALING P M ET AL.: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco" TRANSGENIC RESEARCH, vol. 3, 1994, pages 344-354, XP002091349 US abrégé	1-5, 11
A	WO 93 04586 A (ICI PLC) 18 mars 1993 (1993-03-18) page 1 - page 8	1-12
A	BUNOCORE V ET AL.: "Wheat protein inhibitors of alpha amylase" PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, no. 7, 1977, pages 811-820, XP002091351 OXFORD GB le document en entier	1-12
A	GATEHOUSE A M R ET AL: "IDENTIFYING PROTEINS WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: USE OF ENCODING GENES TO PRODUCE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CROPS" PESTICIDE SCIENCE, vol. 52, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 165-175, XP000751964 le document en entier	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Requête internationale No

PCT/FR 99/01085

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9304586 A	18-03-1993	AU 665020 B	14-12-1995
		AU 2484792 A	05-04-1993
		EP 0602098 A	22-06-1994
		JP 6510535 T	24-11-1994
		NZ 244127 A	22-12-1994
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL PCT

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 31 JUL 2000

WIPO PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPcb539/82	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/01085	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07/05/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 11/05/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/82		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE... et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.



2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 09/12/1999	Date d'achèvement du présent rapport <b>25. 07. 00</b>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Marinoni, J-C N° de téléphone +49 89 2399 8563 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01085

**I. Bas du rapport**

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-17                      version initiale

**Revendications, N°:**

1-12                      version initiale

**Dessins, feuilles:**

1/9-9/9                      version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,      pages :  
☐ des revendications,    n°s :  
☐ des dessins,            feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.  
☒ les revendications n°s 1-3 partiellement.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/01085

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☒ les revendications, ou les revendications n°s 1-3 partiellement en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-3 partiellement; 4-12 complètement Non : Revendications Aucune
Activité inventive	Oui : Revendications 1-3 partiellement; 4-12 complètement Non : Revendications Aucune
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-3 partiellement; 4-12 complètement Non : Revendications Aucune

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Concernant le point III**

**Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

Les exemples de la présente demande démontrent uniquement que la protéine PT (voir page 16, ligne 18-page 17, ligne 12) et les protéines isoformes de la fraction F1 (voir page 11, lignes 33-34) ont une activité insecticide. Cependant, rien dans la présente demande ne permet de conclure de manière évidente que toutes les protéines telles que définies dans les **revendications 1-3**, mises à part à la rigueur les protéines présentant des similitudes avec la protéine Pa1b et les inhibiteurs de protéines telles que les leginsulines évoquées page 3, lignes 21-35, auront une activité insecticide.

L'invention dans son intégralité (en particulier l'objet des **revendications 1-3**) n'est donc pas suffisamment exposée et ne peut donc être mise en pratique sans expérimentation injustifiée (Article 5 PCT).

En conséquence, aucune opinion quant à la nouveauté et l'activité inventive ne peut être donnée concernant l'objet des **revendications 1 à 3** relatif aux protéines autres que celles similaires à l'albumine de pois Pa1b.

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence au document suivant:

**D1:** J. BIOL. CHEM., Vol. 261, No. 24, 25 août 1986, pages 11124-11130, Higgins et al. 'Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds'

1. La présente demande a pour objet l'utilisation comme insecticide de la protéine Pa1b. Aucun des documents disponibles ne décrit une telle utilisation. Par conséquent, l'objet de la présente demande relatif à l'utilisation comme insecticide de cette protéine est conforme aux critères de nouveauté de l'Article 33(2) PCT.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Bien que **D1** décrive le clonage de Pa1b et son homologie avec un certain nombre de protéines de faible poids moléculaire qui constitueraient une super-famille de protéines incluant entre autres les inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase trouvés chez le blé (voir page 11129, colonne de droite, lignes 4-13 et Figure 7), rien ne permet de conclure que (i) Pa1b pourrait avoir une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase ou que (ii) pourrait être utilisé avec succès comme insecticide.

**Concernant le point VIII**

**Observations relatives à la demande internationale**

La **revendication 4** se réfère à "une quelconque des isoformes d'une albumine Pa1b". Cependant, aucun des documents disponibles ne cite de telles isoformes. Afin de répondre aux critères de l'article 6 PCT, la **revendication 4** se doit de comporter les caractéristiques essentielles de l'invention revendiquée. Ici, la définition de l'utilisation des protéines auxquelles la **revendication 4** se réfère n'est possible que si ces isoformes sont clairement caractérisées.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJPcb539/82	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01085	International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)	Priority date (day/month/year) 11 May 1998 (11.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09 December 1999 (09.12.99)	Date of completion of this report 25 July 2000 (25.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01085

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-17, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/9-9/9, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01085

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-3

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 1-3 are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The examples of the present application only demonstrate that the PT protein (see page 16, line 18 to page 17, line 12) and the isoform proteins of the F1 portion (see page 11, lines 33-34) act as an insecticide. However, nothing in the present application clearly demonstrates that all the proteins as defined in **claims 1-3**, except perhaps for the proteins similar to Palb and the protein inhibitors such as the leginsulins mentioned on page 3, lines 21-35, will have an insecticidal effect.

The entire invention (in particular the subject matter of **claims 1-3**) is therefore not sufficiently disclosed and consequently cannot be put into practice without undue experimentation (PCT Article 5).

Therefore, no opinion can be established concerning the novelty and inventive step of the subject matter of **claims 1 to 3** relating to proteins other than those similar to Palb pea albumin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-3 partially, 4-12 completely	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-3 partially, 4-12 completely	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3 partially, 4-12 completely	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

Reference is made to the following document:

**D1:** J. BIOL. CHEM., vol. 261, no. 24, 25 August 1986, pages 11124-11130, Higgins et al. 'Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds'

1. The subject matter of the present application is the use of Palb protein as an insecticide. None of the available documents describes such a use. Therefore, the subject matter of the present application relating to the use of said protein as an insecticide meets the novelty requirements of PCT Article 33(2).

Although **D1** describes cloning Palb and a similar substance with a certain number of proteins having a low molecular weight, which would constitute a super-family of proteins including, among others, the  $\alpha$ -amylase inhibitors found in wheat (see page 11129, right-hand column, lines 4-13 and figure 7), nothing suggests that (i) Palb could have an inhibiting effect on  $\alpha$ -amylase or (ii) that it could be used successfully as an insecticide.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**Claim 4** relates to "any one of the isoforms of a Palb albumin". However, none of the available documents cites such isoforms. In order to meet the requirements of PCT Article 6, **claim 4** must include the features essential to the claimed invention. In the present case, defining the use of the proteins to which **claim 4** refers is only possible if the isoforms are clearly characterized.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01085

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C07K14/415 A01N65/00 C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HIGGINS T J V ET AL: "Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol. 261, no. 24, 25 August 1986 (1986-08-25), pages 11124-11130, XP002091347 MD US cited in the application * The whole document, in particular page 11129 * --- -/--	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 1999

Date of mailing of the international search report

16/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01085

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAKER J E ET AL: "Multiplicity of albumins from wheat inhibitory to amylase from the rice weevil coleoptera curculionidae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, ✓ vol. 82, no. 6, 1989, pages 1548-1553, XP002091350 abstract	1-12
A	WATANABE Y ET AL: "A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein" THE EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, ✓ vol. 224, no. 1, August 1994 (1994-08), pages 167-172, XP002091348 BERLIN DE cited in the application the whole document	1-5,11
A	EALING P M ET AL.: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco" ✓ TRANSGENIC RESEARCH, vol. 3, 1994, pages 344-354, XP002091349 US abstract	1-5,11
A	WO 93 04586 A (ICI PLC) ✓ 18 March 1993 (1993-03-18) page 1 - page 8	1-12
A	BUONOCORE V ET AL.: "Wheat protein inhibitors of alpha amylase" PHYTOCHEMISTRY, ✓ vol. 16, no. 7, 1977, pages 811-820, XP002091351 OXFORD GB the whole document	1-12
A	GATEHOUSE A M R ET AL: "IDENTIFYING PROTEINS WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: USE OF ENCODING GENES TO PRODUCE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CROPS" ✓ PESTICIDE SCIENCE, vol. 52, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 165-175, XP000751964 the whole document	1-12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9304586 A	18-03-1993	AU 665020 B	14-12-1995
		AU 2484792 A	05-04-1993
		EP 0602098 A	22-06-1994
		JP 6510535 T	24-11-1994
		NZ 244127 A	22-12-1994

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année)

14 janvier 2000 (14.01.00)

Demande internationale no

PCT/FR99/01085

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

MJPcb539/82

Date du dépôt international (jour/mois/année)

07 mai 1999 (07.05.99)

Date de priorité (jour/mois/année)

11 mai 1998 (11.05.98)

Déposant

DELOBEL, Bernard etc

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

09 décembre 1999 (09.12.99)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Jean-Marie McAdams

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

**NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE**

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire:

VIALLE-PRESLES, Marc  
Cabinet Ores  
6, avenue de Messine  
F-75008 Paris  
FRANCE

**CABINET ORES****25 JUN 1999**

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 juin 1999 (17.06.99)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire MJPCb539/82	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Demande internationale no PCT/FR99/01085	Date du dépôt international (jour/mois/année) 07 mai 1999 (07.05.99)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 11 mai 1998 (11.05.98)
Déposant  INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(\*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
11 mai 1998 (11.05.98)	98/05877	FR	16 juin 1999 (16.06.99)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Marc Salzman

no de téléphone (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

**PCT**

## AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

VIALLE-PRESLES, Marie-José

Cabinet Ores

6, avenue de Messine

F-75008 Paris

FRANCE

**CABINET ORÈS**

**29.NOV.1999**

Date d'expédition (jour/mois/année)

18 novembre 1999 (18.11.99)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

MJPcb539/82

**AVIS IMPORTANT**

Demande internationale no

PCT/FR99/01085

Date du dépôt international (jour/mois/année)

07 mai 1999 (07.05.99)

Date de priorité (jour/mois/année)

11 mai 1998 (11.05.98)

Déposant

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE etc

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:

AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le

18 novembre 1999 (18.11.99) sous le numéro WO 99/58695

### RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la **demande d'examen préliminaire international** doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

### RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI

34, chemin des Colombettes

1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

J. Zahra

no de téléphone (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# PCT

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>MJPcb539/82</b>	<b>POUR SUITE</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après <b>A DONNER</b>	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 99/ 01085</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>07/05/1999</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>11/05/1998</b>
Déposant  <b>INSTITUT NAT.DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE et al.</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

### 1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No

/FR 99/01085

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/82 C07K14/415 A01N65/00 C12N15/29

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>HIGGINS T J V ET AL: "Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS),</p> <p>vol. 261, no. 24,</p> <p>25 août 1986 (1986-08-25), pages 11124-11130, XP002091347</p> <p>MD US</p> <p>cité dans la demande</p> <p>* le document en entier, particulièrement page 11129 *</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

De Kok, A

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	BAKER J E ET AL: "Multiplicity of albumins from wheat inhibitory to amylase from the rice weevil coleoptera curculionidae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, vol. 82, no. 6, 1989, pages 1548-1553, XP002091350 abrégé	1-12
A	--- WATANABE Y ET AL: "A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein" THE EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 224, no. 1, août 1994 (1994-08), pages 167-172, XP002091348 BERLIN DE cité dans la demande le document en entier	1-5, 11
A	--- EALING P M ET AL.: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco" TRANSGENIC RESEARCH, vol. 3, 1994, pages 344-354, XP002091349 US abrégé	1-5, 11
A	--- WO 93 04586 A (ICI PLC) 18 mars 1993 (1993-03-18) page 1 - page 8	1-12
A	--- BUONOCORE V ET AL.: "Wheat protein inhibitors of alpha amylase" PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, no. 7, 1977, pages 811-820, XP002091351 OXFORD GB le document en entier	1-12
A	--- GATEHOUSE A M R ET AL: "IDENTIFYING PROTEINS WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: USE OF ENCODING GENES TO PRODUCE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CROPS" PESTICIDE SCIENCE, vol. 52, no. 2, février 1998 (1998-02), pages 165-175, XP000751964 le document en entier -----	1-12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

/FR 99/01085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9304586 A	18-03-1993	AU 665020 B	14-12-1995
		AU 2484792 A	05-04-1993
		EP 0602098 A	22-06-1994
		JP 6510535 T	24-11-1994
		NZ 244127 A	22-12-1994
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01085

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/82 C07K14/415 A01N65/00 C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HIGGINS T J V ET AL: "Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS),</p> <p>vol. 261, no. 24,</p> <p>25 August 1986 (1986-08-25), pages</p> <p>✓ 11124-11130, XP002091347</p> <p>MD US</p> <p>cited in the application</p> <p>* The whole document, in particular page 11129 *</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 1999

Date of mailing of the international search report

16/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/01085

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAKER J E ET AL: "Multiplicity of albumins from wheat inhibitory to amylase from the rice weevil coleoptera curculionidae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, ✓ vol. 82, no. 6, 1989, pages 1548-1553, XP002091350 abstract	1-12
A	WATANABE Y ET AL: "A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein" THE EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, ✓ vol. 224, no. 1, August 1994 (1994-08), pages 167-172, XP002091348 BERLIN DE cited in the application the whole document	1-5,11
A	EALING P M ET AL.: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco" ✓ TRANSGENIC RESEARCH, vol. 3, 1994, pages 344-354, XP002091349 US abstract	1-5,11
A	WO 93 04586 A (ICI PLC) ✓ 18 March 1993 (1993-03-18) page 1 - page 8	1-12
A	BUONOCORE V ET AL.: "Wheat protein inhibitors of alpha amylase" PHYTOCHEMISTRY, ✓ vol. 16, no. 7, 1977, pages 811-820, XP002091351 OXFORD GB the whole document	1-12
A	GATEHOUSE A M R ET AL: "IDENTIFYING PROTEINS WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: USE OF ENCODING GENES TO PRODUCE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CROPS" ✓ PESTICIDE SCIENCE, vol. 52, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 165-175, XP000751964 the whole document	1-12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

National Application No

PCT/FR 99/01085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9304586 A	18-03-1993	AU 665020 B	14-12-1995
		AU 2484792 A	05-04-1993
		EP 0602098 A	22-06-1994
		JP 6510535 T	24-11-1994
		NZ 244127 A	22-12-1994
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference MJPcb539/82	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/01085	International filing date (day/month/year) 07 May 1999 (07.05.99)	Priority date (day/month/year) 11 May 1998 (11.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 09 December 1999 (09.12.99)	Date of completion of this report 25 July 2000 (25.07.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01085

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-17, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-12, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/9-9/9, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/01085

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-3

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ the claims, or said claims Nos. 1-3 are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01085

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The examples of the present application only demonstrate that the PT protein (see page 16, line 18 to page 17, line 12) and the isoform proteins of the F1 portion (see page 11, lines 33-34) act as an insecticide. However, nothing in the present application clearly demonstrates that all the proteins as defined in **claims 1-3**, except perhaps for the proteins similar to Palb and the protein inhibitors such as the leginsulins mentioned on page 3, lines 21-35, will have an insecticidal effect.

The entire invention (in particular the subject matter of **claims 1-3**) is therefore not sufficiently disclosed and consequently cannot be put into practice without undue experimentation (PCT Article 5). -

Therefore, no opinion can be established concerning the novelty and inventive step of the subject matter of **claims 1 to 3** relating to proteins other than those similar to Palb pea albumin.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01085

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>1-3 partially, 4-12 completely</u>	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>1-3 partially, 4-12 completely</u>	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-3 partially, 4-12 completely</u>	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

**D1:** J. BIOL. CHEM., vol. 261, no. 24, 25 August 1986, pages 11124-11130, Higgins et al. 'Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds'

1. The subject matter of the present application is the use of Palb protein as an insecticide. None of the available documents describes such a use. Therefore, the subject matter of the present application relating to the use of said protein as an insecticide meets the novelty requirements of PCT Article 33(2).

Although **D1** describes cloning Palb and a similar substance with a certain number of proteins having a low molecular weight, which would constitute a super-family of proteins including, among others, the  $\alpha$ -amylase inhibitors found in wheat (see page 11129, right-hand column, lines 4-13 and figure 7), nothing suggests that (i) Palb could have an inhibiting effect on  $\alpha$ -amylase or (ii) that it could be used successfully as an insecticide.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01085

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**Claim 4** relates to "any one of the isoforms of a Palb albumin". However, none of the available documents cites such isoforms. In order to meet the requirements of PCT Article 6, **claim 4** must include the features essential to the claimed invention. In the present case, defining the use of the proteins to which **claim 4** refers is only possible if the isoforms are clearly characterized.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/FR 99/01085

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C07K14/415 A01N65/00 C12N15/29

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HIGGINS T J V ET AL: "Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seeds"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. (MICROFILMS), vol. 261, no. 24, 25 August 1986 (1986-08-25), pages 11124-11130, XP002091347 MD US</p> <p>cited in the application</p> <p>* The whole document, in particular page 11129 *</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 1999

Date of mailing of the international search report

16/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BAKER J E ET AL: "Multiplicity of albumins from wheat inhibitory to amylase from the rice weevil coleoptera curculionidae" JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, vol. 82, no. 6, 1989, pages 1548-1553, XP002091350 abstract ----	1-12
A	WATANABE Y ET AL: "A peptide that stimulates phosphorylation of the plant insulin-binding protein" THE EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 224, no. 1, August 1994 (1994-08), pages 167-172, XP002091348 BERLIN DE cited in the application the whole document ----	1-5,11
A	EALING P M ET AL.: "Expression of the pea albumin gene in transgenic white clover and tobacco" TRANSGENIC RESEARCH, vol. 3, 1994, pages 344-354, XP002091349 US abstract ----	1-5,11
A	WO 93 04586 A (ICI PLC) 18 March 1993 (1993-03-18) page 1 - page 8 ----	1-12
A	BUONOCORE V ET AL.: "Wheat protein inhibitors of alpha amylase" PHYTOCHEMISTRY, vol. 16, no. 7, 1977, pages 811-820, XP002091351 OXFORD GB the whole document ----	1-12
A	GATEHOUSE A M R ET AL: "IDENTIFYING PROTEINS WITH INSECTICIDAL ACTIVITY: USE OF ENCODING GENES TO PRODUCE INSECT-RESISTANT TRANSGENIC CROPS" PESTICIDE SCIENCE, vol. 52, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 165-175, XP000751964 the whole document -----	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9304586 A	18-03-1993	AU 665020 B	14-12-1995
		AU 2484792 A	05-04-1993
		EP 0602098 A	22-06-1994
		JP 6510535 T	24-11-1994
		NZ 244127 A	22-12-1994
<hr/>			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**